

# 鸡 $\gamma$ -干扰素基因重组质粒在工程菌株中的 稳定性研究

王宏华<sup>1</sup> 凌红丽<sup>1\*</sup> 侯竹美<sup>2</sup> 梁晶晶<sup>2</sup> 马向东<sup>1</sup> 王 雷<sup>1</sup> 李志中<sup>1</sup> 孙海新<sup>1</sup> 赵玉惠<sup>1</sup>

(1. 青岛康地恩实业有限公司 青岛 266111)

(2. 青岛农业大学水产学院 青岛 266109)

**摘 要:** 本文通过传代的方法研究了鸡  $\gamma$ -干扰素基因的重组质粒 pET-ChIFN- $\gamma$  在工程菌 CH1 中的遗传稳定性。结果表明重组质粒在没有筛选压力下存在质粒不稳定性, 100 代时质粒稳定性只有 69%。适当的筛选压力可以显著降低质粒的遗传不稳定性, 100 代时稳定性提高到 95%。各代重组菌株在生长性能、质粒酶切图谱、蛋白表达等方面均保持一致, 未见明显差异。生物活性检测原代和 100 代均达到  $1.0 \times 10^5$  IU/mL 以上。以上结果表明重组质粒 pET-ChIFN- $\gamma$  在工程菌株 CH1 中具有良好的遗传稳定性, 其质粒遗传不稳定性可由适当的筛选压力来控制。

**关键词:** 鸡  $\gamma$ -干扰素, 遗传稳定性, 质粒稳定性, 传代

## Study on the Heredity Stability of a Recombinant Plasmid pET-ChIFN- $\gamma$ in *Escherichia coli*

WANG Hong-Hua<sup>1</sup> LING Hong-Li<sup>1\*</sup> HOU Zhu-Mei<sup>2</sup> LIANG Jing-Jing<sup>2</sup>  
MA Xiang-Dong<sup>1</sup> WANG Lei<sup>1</sup> LI Zhi-Zhong<sup>1</sup> SUN Hai-Xin<sup>1</sup> ZHAO Yu-Hui<sup>1</sup>

(1. Qingdao Continent Co. Ltd., Qingdao 266111)

(2. Aquaculture College, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

**Abstract:** A novel recombinant *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET-ChIFN- $\gamma$  was successfully constructed for high expression of chicken interferon- $\gamma$  (ChIFN- $\gamma$ ), and the heredity stability of pET-ChIFN- $\gamma$  was mainly focused on. It was segregationally unstable of the plasmid under no kanamycin selection pressure, only 69% cells containing plasmid after 100 generations. But it could be controlled by the supplementation of kanamycin pressure. The growth characteristics and the morphology of the cultures did not show differences among the generations. The chromatogram of the plasmids between origin strain and 100<sup>th</sup> generation strain digested by restriction enzymes were same, as well as ChIFN- $\gamma$  expression level, biological activities showed no difference among the generations. It is indicated that recombinant strain CH1 has high heredity stability.

**Keywords:** ChIFN- $\gamma$ , Heredity stability, Plasmid stability, Generations

鸡  $\gamma$ -干扰素 (ChIFN- $\gamma$ ) 是由 Digby 等<sup>[1]</sup> 于 1994 年克隆得到的, 属于 II 型干扰素。进一步的研究证明

其具有抗病毒<sup>[2]</sup>、免疫调节<sup>[3]</sup>和疫苗佐剂效应<sup>[4]</sup>等多方面的生物活性。我国是养禽业大国, 研发具

有抗病毒活性和免疫调节活性的鸡  $\gamma$ -干扰素在禽病防治上具有十分重要的意义。本实验室根据 Kaiser 等发表的 ChIFN- $\gamma$  基因序列 (NCBI 登录号: NM\_205149), 去掉信号肽区, 对其成熟肽区进行大肠杆菌密码子偏好性改造, 构建了重组鸡  $\gamma$ -干扰素质粒 pET-ChIFN- $\gamma$ , 转化大肠杆菌 BL21(DE3)成功构建了能高效表达重组 ChIFN- $\gamma$  的工程菌株 CH1。重组 ChIFN- $\gamma$  经初步纯化后在鸡胚成纤维细胞上具有明显的抗病毒活性, 显示了良好的开发潜力。

工程菌株的遗传稳定性和有限传代次数的确定在生产实践中至关重要, 也是医药监督管理局对基因工程药物评审的一个重要内容<sup>[5]</sup>。为了确定原始种子库和传代工程菌株的遗传稳定性, 本文对工程菌株进行了传代培养, 并对不同代次菌株的培养特性和菌落形态特征、质粒的限制酶切图谱、目的蛋白表达图谱及活性水平等方面进行了比较分析, 以期重组 ChIFN- $\gamma$  的工业化生产提供相关的理论数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

限制性内切酶 *Nco*、*Hind* 购自 TaKaRa 公司。其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 菌株和培养基

工程菌株 CH1 (含 pET-ChIFN- $\gamma$  质粒) 由本实验室构建并保存。

LB 培养基 (1 L): 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, pH 值调至 7.0, 高压蒸汽灭菌。固体培养基另加琼脂粉 15 g。

### 1.3 菌株传代方法

根据李莉等<sup>[6]</sup>方法稍加调整。从原代菌株平皿中挑取单菌落接种于含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 200 r/min 振摇过夜培养, 第 2 天按 1% 的接种量分别接种含卡那霉素和不含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 连续振摇培养, 每隔 6 h 转管, 间隔一定时间取样, 取得不同代数的菌液。

分别取第 0、20、40、60、80、100 代菌株适量稀释, 涂布于空白 LB 平板, 37  $^{\circ}$ C 过夜培养, 分别挑取单菌落 100 个到空白 LB 平板和含卡那霉素的 LB 平板, 37  $^{\circ}$ C 过夜培养, 计算工程菌 CH1 在有无卡那霉素选择压力下传代时质粒丢失率。

质粒稳定性 = 含卡那霉素 LB 平板上菌落数 / 空白 LB 平板上菌落数

### 1.4 菌落形态和生长观察

用接种环挑取菌落, 涂布于含卡那霉素的 LB 平板, 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h, 与从原代种子接出的培养物对比, 观察菌落形态变化。

接种单菌落到含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养 15 h, 用空白 LB 培养基作为对照, 测定  $OD_{600}$ , 确定生长速度的变化。

### 1.5 质粒酶切鉴定

传代过程中, 挑取原代、100 代单菌落于 5 mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜, 用碱裂解法提取质粒, 重溶于 20  $\mu$ L TE buffer 中, 取 4  $\mu$ L 用 *Nco* 和 *Hind* 双酶切, 1% 琼脂糖电泳鉴定酶切片段。

### 1.6 ChIFN- $\gamma$ 在工程菌株中的表达

分别挑取第 0、20、40、60、80、100 代工程菌株 CH1 的单菌落到含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜, 次日按 3% 接种量接种到含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养 4 h 后, 加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 诱导 5 h 后, 取 1 mL 培养液离心收集菌体, SDS-PAGE 胶检测蛋白表达。

### 1.7 重组 ChIFN- $\gamma$ 生物活性

取各代次诱导表达液离心收集菌体, PBS 液重悬, 超声波破碎菌体, 离心收集上清, 采用病毒抑制法测定其抗病毒活性<sup>[7]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 菌落形态与生长

在含卡那霉素平板上生长的菌落直径大小范围为 1 mm~2 mm 的圆形隆起, 菌落平均直径为 1.5 mm, 外表湿润光滑, 白色, 为典型的大肠杆菌菌落, 无杂菌生长。液体培养基的原代和第 100 代工程菌株 15 h 的  $OD_{600}$  值分别为 2.65 和 2.69, 无明显差别。

### 2.2 质粒稳定性观察

工程菌株 CH1 在没有筛选压力和有筛选压力下的质粒稳定性如下表 1。结果说明没有筛选压力下质粒存在不稳定性, 到第 100 代时质粒丢失率就达到了 31%。适当的筛选压力则可以大大减轻质粒丢失, 维持重组菌的稳定。

表 1 工程菌株 CH1 的质粒稳定性		
Table 1 Plasmid stability of the CH1 strain		
代数 Generations	质粒稳定性 Plasmid stability (%)	
	无筛选压力 No selection pressure	有筛选压力 Selection pressure
0	100	100
20	91	100
40	91	98
60	86	98
80	79	97
100	69	95

2.3 质粒酶切鉴定

重组质粒 *Nco* 和 *Hind* 双酶切可以切出大小为约 440 bp 的插入片段, 从图 1 的酶切电泳图谱可以看出, 经传代 100 代后, 重组质粒的酶切图谱与原代没有差异。测序结果也证明基因序列正确无误。

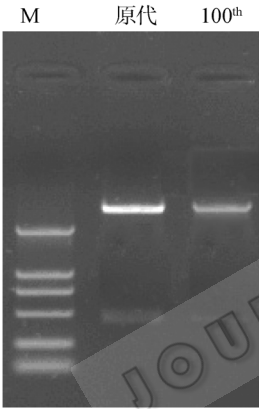


图 1 原代与第 100 代质粒双酶切图谱  
Fig. 1 Chromatogram of the plasmids between origin strain and 100<sup>th</sup> generation strain digested by restriction enzymes

2.4 SDS-PAGE 鉴定

在 CH1 工程菌株中表达的 ChIFN- $\gamma$  蛋白其理论分子量大小约为 20 kD(图 2)。原代菌种与各代的菌种在总蛋白电泳模式中所有蛋白条带位置保持一致, 其中表达产生的 ChIFN- $\gamma$  水平也无明显差别。

2.5 重组 ChIFN- $\gamma$  生物活性比较

采用病毒抑制法测定其抗病毒活性。在菌体湿重相同, 裂解液体积相同的情况下各取 5  $\mu$ L 裂解上清进行测定, 测定结果表明经过连续传 100 代后各代 ChIFN- $\gamma$  活性均在  $1.0 \times 10^5$  IU/mL 以上, 未见明显差异。

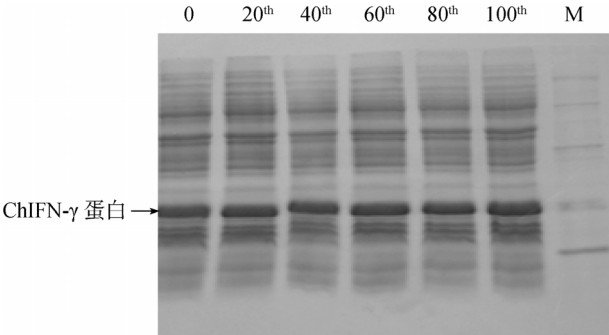


图 2 原代和第 20、40、60、80 和 100 代工程菌表达蛋白的 SDS-PAGE  
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression for ChIFN- $\gamma$  by the generations

3 讨论

基因工程菌株的遗传稳定性是确定工业化生产中种子库建立规模的重要参数。工程菌株中质粒的稳定性也是基因工程药物进行放大生产的主要限制性因素。质粒不稳定性分为分裂不稳定和结构不稳定, 分裂不稳定指工程菌分裂时出现一定比例不含质粒的子代菌的现象, 结构不稳定指外源基因从质粒上丢失或碱基重排、缺失所致工程菌性能的改变<sup>[5]</sup>。

本文构建的重组工程菌 CH1 在无筛选压力下存在质粒丢失现象, 传 100 代时质粒稳定率只有 69%。双酶切结果显示工程菌株 CH1 携带的重组质粒在传代前后的限制性内切酶图谱没有发生变化, 进一步的 DNA 序列测定表明, 插入的 ChIFN- $\gamma$  基因没有发生突变, 这都说明该重组质粒在工程菌株 CH1 中具有良好的结构稳定性, 工程菌 CH1 的不稳定性是由分离不稳定性造成的。原因可能是重组质粒的存在对菌株的生长造成了一定的压力, 同时菌株的快速分裂增殖和质粒分配的不同步使得部分菌株丧失了重组质粒, 且随着代数的增加丢失质粒的菌数逐渐取得优势。而在筛选压力下重组菌传代则较为稳定, 到 100 代工程菌依然保持 95% 以上的质粒稳定率。目前提高质粒稳定性的方法主要有增加筛选压力、质粒分子进行改造和优化发酵工艺等多种方法<sup>[5]</sup>。本试验表明在发酵体系加入一定的筛选压力可以显著提高重组质粒稳定性, 避免空菌的生长。另一方面, 尽管质粒具有分离不稳定性, 但它仍然能够在无抗生素选择压力条件下, 在 48 世代内保持质粒的

基本稳定遗传, 该性能已经足够满足工业生产的需要<sup>[8]</sup>。

工程菌株 CH1 经连续传 100 代以后, 依然保持典型的大肠杆菌菌落形态, 在含卡那霉素的 LB 液体培养基中生长性能未变, 经 IPTG 诱导培养后, ChIFN- $\gamma$  在各代中都可以表达, 表达量没有明显差别。它们在 SDS-PAGE 中的带型基本一致, 并且生物活性检测显示它们均具有生物学活性, 其质粒在 48 世代内基本保持稳定遗传, 其质粒的不稳定性也可以通过加入适当的筛选压力避免, 这些都说明重组质粒在工程菌株 CH1 中具有良好的遗传稳定性, 对其进行工业化生产是可行的。

## 参 考 文 献

- [1] Digby MR, Lowenthal JW. Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene. *J Interferon Cytokine Res*, 1995, **15**(11): 939-945.
- [2] Levy AM, Heller ED, Leitner G, *et al.* Effect of native chicken interferon on MDV replication. *J Acta Virol*, 1999, **43**(23): 121-127.
- [3] Weining KC, Schultz U, Munster U, *et al.* Biological properties of recombinant chicken interferon-gamma. *J Immunol*, 1996, **26**(10): 2440-2447.
- [4] Lowenthal JW, O'Neil TE, Broadway M, *et al.* Coadministration of IFN-gamma enhances antibody responses in chickens. *J Interferon Cytokine Res*, 1998, **18**(8): 617-622.
- [5] 葛保胜, 任育红, 唐志红, 等. 表达重组别藻蓝蛋白质粒在工程菌株中的遗传稳定性研究. 微生物学通报, 2005, **32**(4): 37-41.
- [6] 李 莉, 范小连, 何丽敏, 等. 125Ser-rIL-2 工程菌稳定性研究. 中国医药工业杂志, 1996, **27**(4): 158-160.
- [7] 蔡梅红, 曹瑞兵, 周 斌, 等. 鸡  $\gamma$  干扰素成熟蛋白基因的表达及其产物抗病毒活性测定. 中国病毒学, 2004, **19**(1): 32-35.
- [8] 史 悦, 于慧敏, 田卓玲, 等. 产腈水合酶重组大肠杆菌的质粒稳定性研究. 中国生物工程杂志, 2005, **25**(8): 70-75.

## 稿件书写规范

### 高等院校教学栏目简介及撰稿要求

“高等院校教学”是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教學类栏目, 也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为高等院校教师开辟, 是生物学教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其它实验类研究报告, 特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线, 撰写的稿件内容必须要有新意、要实用, 不是泛泛地叙述教学设计与过程, 而是确实有感而发, 是教学工作中的创新体会, 或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性, 做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进, 注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中, 只有这样才能真正起到教与学的互动, 促进高校生物学教学的发展, 更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时, 为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台, 本栏目还开辟了“名师讲堂”版块。旨在通过推广名家的教学经验, 帮助青年教师尽快成长, 进一步提高教学质量。欢迎获得国家级“名师奖”或教育部“精品课程”等奖项的专家教授们积极撰稿, 将你们在教学领域获得的经验和成功体会通过这个栏目展示出来。对于入选“名师讲堂”版块的文章, 本刊将开辟快速审稿通道, 优先发表, 并免收审理费和版面费, 支付优厚的稿酬。刊发时还将在正文前附作者简介和大幅彩照, 以鼓励和褒奖教学名家不吝赐稿, 让所有的读者分享他们的经验和心得。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!